Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr.med. H. A. Kühn

ENZYMAKTIVITÄTEN IN AUTOLYSIERENDER RATTENLEBER UND IN MENSCHLICHER LEICHENLEBER

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Christine Berger
aus Völklingen/Saar

Würzburg, 23.5.1980

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr.med. H. A. Kühn

ENZYMAKTIVITÄTEN IN AUTOLYSIERENDER RATTENLEBER UND IN MENSCHLICHER LEICHENLEBER

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Christine Berger
aus Völklingen/Saar

Würzburg, 23.5.1980

Referent: Privatdozent Dr. H. Gallenkamp

Korreferent: Prof. Dr. H. A. Kühn

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinem Mann

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0123

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	4
2.1.	Tiere	4
2.2.	Reagenzien	4
2.3.	Versuchsaufbau	4
2.3.1.	Tierversuch	4
2.3.2.	Versuche mit menschlicher Leichenleber	5
2.4.	Mikrosomenpräparation	5
2.5.	Bestimmungsmethoden	6
2.6.	Statistik	13
3.	ERGEBNISSE	14
3.1.	Tierversuche	15
3.1.1.	Mikrosomales Protein	15
3.1.2.	Mikrosomale Enzymaktivitäten	16
3.1.3.	Fremdstoffabbau	18
3.1.4.	Korrelationen	22
3.2.	Untersuchungen an Leichenlebern	28
4.	DISKUSSION	34
5.	ZUSAMMENFASSUNG	40
6.	LITERATURVERZEICHNIS	42

1. EINLEITUNG

Für viele Erkrankungen des Menschen wäre die Untersuchung des biochemischen, morphologischen und funktionellen Zustandes der Leber von Interesse. Eine gleichzeitige Untersuchung scheitert jedoch im allgemeinen daran, daß nur sehr wenig Material gewonnen werden kann. So reicht das anläßlich einer in vivo durchgeführten Punktion gewonnene Gewebe gerade für die histologische Aufbereitung. Insbesondere ist es von Interesse, die Funktion der erkrankten Leber in Beziehung zu biochemischen und morphologischen Veränderungen zu setzen, da sich hier möglicherweise Ansatzpunkte für eine Therapie ergeben könnten. Als biochemisch meßbare Funktion hat sich die Untersuchung von mikrosomalen Enzymen, darunter des Fremdstoffe abbauenden Enzymsystems der Leber, bewährt (REMMER et al. (33)). Diese Funktion kann dann zu biochemisch faßbaren Veränderungen der endoplasmatischen Membran bzw. deren Bausteinen Cholesterin, Phospholipide, Protein und Cytochrom P 450 in Beziehung gebracht werden.

Alle diese Untersuchungen sind jedoch nur möglich, wenn die für die heutige Methodik erforderliche Menge an Lebergewebe vorliegt. Das für Untersuchungen am Menschen notwendige Lebergewebe in der Größenordnung von mehreren Gramm kann aus ethischen Gründen intra vitam nicht gewonnen werden, so daß für Untersuchungen dieser Art lediglich Leichenleber zur Verfügung steht.

Postmortal kommt es jedoch zeitabhängig zu erheblichen Veränderungen der biochemischen Zusammensetzung der Funktion und der anatomischen Struktur. So sind nach SCARPELLI und TRUMP (37) folgende Schädigungszeichen einer Zelle beschrieben: Zunächst Verlust der Volumenkontrolle; Schwellung der verschiedenen Zellkompartimente mit Abnahme der Zytoplasmadichte; im Rahmen einer zytoplasmatischen Phasenentmischung

Bildung von Fettropfen; Anschwellung des Kerns; Kernpyknose. Wird ein bestimmter Grad des Schädigungsmusters überschritten, beginnt die Zellnekrose, der Zellstoffwechsel bricht zusammen und in der Zelle treten die charakteristischen Veränderungen des Zelltodes auf. Ursache dafür ist zunächst nach dem Tod die Ischämie infolge Stillstands des Blutkreislaufs (36). Von Wichtigkeit ist in diesem Zusammenhang, daß sich nach einer einstündigen Autolyse das Lysosomeneinzelvolumen verdreifacht (28). Außerdem nimmt die Zahl der Lysosomen innerhalb einer Zelle um 35 % zu, während sich nach einer Stunde Ischämiezeit die mit Ribosomen besetzte Membranoberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums um 50 % verringert und eine Zunahme der degranulierten Membranoberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums auf das Dreieinhalbfache festzustellen ist. Das Gesamtvolumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums innerhalb eines Hepatozyten ist nach einer Stunde Autolyse jedoch noch nicht verändert (36).

Bei den von NUNLEY et al. (26) beschriebenen dunkel begrenzten und in den hepatischen Sinusoiden lokalisierten Zellen der postmortalen Rattenleber dürfte es sich um RES-Zellen bzw. Kupffer'sche Sternzellen handeln.

KARASEC (18) charakterisiert erste postmortale Veränderungen bei der Autolyse normaler Rattenleberzellen als Fragmentation der Perichromatinfibrillen und Verschwinden der Perichromatingranula.

Veränderungen dieser Art sind u.a. temperaturabhängig. So konnte MARSHALL (23) nachweisen, daß in den ersten zwei Stunden postmortal keine wesentliche Änderung der Temperatur auftritt, während nach etwa sechs Stunden ein Abfall der Temperatur von 36,1 auf etwa 27,7 ^{o}C eintritt. Nach tierexperimentellen Untersuchungen von RAFFUCCI et al. (31) finden sich bei einer Körpertemperatur von 22 ^{o}C Lebernekrosen.

Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung menschlicher Leichenleber (10) weisen nach, daß bei fettiger Degeneration die Vermehrung der Triglyceride nicht von einem signifikanten Anstieg des Cholesterin- oder Phospholipidgehaltes begleitet ist.

BARKERs (1) Untersuchungen an menschlicher Leichenleber zur arzneimittelabbauenden Aktivität zeigten erhebliche Schwankungen der Meßwerte, die nicht mit der Länge des postmortalen Intervalls zu korrelieren scheinen. Diese Unterschiede können einmal durch Abweichungen des einzelnen Individuums bedingt sein, zum anderen aber auch durch Unterschiede im postmortalen Verlust der Enzymaktivität.

Diese Zitate zeigen die Schwierigkeiten auf, die bei der Beurteilung postmortal gewonnenen Untersuchungsmaterials entstehen.

Um eine Korrelation von biochemischer Zusammensetzung, Funktion und histologischen Befunden zu erzielen, ist es erforderlich, über die Veränderungen, die postmortal auftreten, Aufschluß zu erhalten. Es ist daher das Ziel dieser Arbeit, zunächst an autolysierender Rattenleber einen Aufschluß zu gewinnen über das Verhalten mikrosomaler Enzymaktivitäten und diese in Beziehung zu einem Baustein des endoplasmatischen Retikulums - zum mikrosomalen Protein sowie zum Cytochrom P 450 - zu setzen. Aus methodischen Gründen werden neben dem Zeitpunkt Null Untersuchungen nach 6- und 24stündiger Autolyse durchgeführt. Diese Werte sind Ausgangspunkt für eine Beurteilung der Veränderungen, die sich beim Menschen bis zu vier Stunden postmortal einstellen. Diese Veränderungen sollen dann in Einzelfällen in Bezug zum Proteingehalt, Cytochrom P 450-Gehalt und Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase gesetzt werden.

2. METHODIK

2.1. Tiere

Bei allen Versuchen wurden männliche Wistarratten (400 - 500 g) der Firma Dr. Karl Thomae, Biberach a.d.Riss, verwandt.

2.2. Reagenzien

SVT/HCl-Puffer (pH = 7,4):
- Saccharose 2.5 x 10^{-1} m (Fa. Merck Darmstadt)
- Versen = Titriplex^{R} III x 2 H_2O 10^{-3} m (Fa. Merck Darmstadt)
- Tris p.a. 2 x 10^{-2} m (Fa. Merck Darmstadt)

NADPH (Fa. Boehringer Mannheim)
Cytochrom C (Fa. Boehringer Mannheim)
Kieselgel H (nach STAHL) (Fa. Merck Darmstadt)
Isocitratdehydrogenase (Fa. Boehringer Mannheim)
Isocitrat (Fa. Sigma München)
Glucose-6-Phosphat (Dinatriumsalz) (Fa. Boehringer Mannheim)

Alle übrigen Reagenzien waren analysenreine Handelspräparate.

2.3. Versuchsaufbau

2.3.1. Tierversuch

Männliche Wistarratten wurden bei normaler Futter- und Wassergabe in Käfigen gehalten und jeweils 12 h vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt. Das Körpergewicht lag wegen der notwendigen Aufteilung der Leber in drei Teile bei ca. 500 g. Am Versuchstag wurde den Tieren in leichter Aethernarkose die Leber entnommen und in drei Portionen aufge-

teilt. Die erste Portion wurde sofort zu Rohhomogenat und Mikrosomen verarbeitet. Die zweite und dritte Portion wurden in einer Petrischale, deren Boden mit 0,9 % NaCl benetzt war, unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur aufbewahrt und 6 h und 24 h später wie die erste Portion aufbereitet. Nach dem Homogenisieren der Leber wurden Mikrosomen präpariert. Gemessen wurden Proteingehalt (4) und Cytochrom P 450 (in Rohhomogenat und Mikrosomen) (27), ferner die Aktivitäten der NADPH-Cytochrom c Reduktase (EC 1.6.2.3.) (24), der Glucose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9) (15), der Anilinhydroxylase (38) und der Aminopyrin-N-Demethylase (5).

2.3.2. Versuche mit menschlicher Leichenleber

Es wurde ebenfalls das Verhalten autolysierender Menschenleber untersucht. Dazu wurde postmortal durch Punktion mit einem speziell angefertigten Stanzzylinder nach Anlegen eines 5 cm langen Hautschnitts ein Leberzylinder (ca. 5 - 10 g) entnommen, der zunächst homogenisiert und dann in unten beschriebener Weise zu Mikrosomen verarbeitet wurde. Untersucht wurden die gleichen Parameter wie im Tierversuch. Zusätzlich wurden Lipide aus Mikrosomen nach FOLCH (12) extrahiert, dünnschichtchromatographisch nach PARKER und PETERSEN (29) aufgetrennt und nach BARTLETT (2) über den Phosphatgehalt gemessen.

2.4. Mikrosomenpräparation

Die Präparation der Mikrosomen wurde in Abänderung nach der Methode von HOGEBOOM und SCHNEIDER (16, 39) vorgenommen:

1.) Die ausgeblutete und von Bindegewebe freipräparierte Leber wurde mit ca. 20 ml SVT-Puffer homogenisiert, das Homogenat anschließend mit Puffer im Verhältnis 1 : 10 gemischt.

2.) In einer Sorvall Zentrifuge (Sorvall RC-2, Rotor SS 34) wurde das Homogenat 20 Minuten lang bei 13.000 Upm (ca. 20.200 x g) zentrifugiert (im Sediment: Kerne, Zelltrümmer und Mitochondrien). Der Überstand wurde auf die gleiche Weise noch einmal zentrifugiert.

3.) Der Überstand nach der zweiten Sorvall-Zentrifugation wurde in Spinco-Röhrchen (Spinco L 2-50 B) (jeweils ca. 30 ml) überführt und in einer Ultrazentrifuge (30er Rotor) 90 Minuten lang bei 30.000 Upm (ca. 105.000 x g) zentrifugiert.

4.) Das Sediment wurde mit 1.18 %iger Kaliumchlorid-Lösung gewaschen und homogenisiert, erneut in Spinco-Röhrchen gegeben und bei 30.000 Upm für 90 Minuten zentrifugiert.

5.) Das so gewonnene Sediment wurde anschließend in Tris/HCl-Puffer aufgenommen (entsprechend der Molarität und dem pH-Wert der zu untersuchenden Enzyme) und homogenisiert.

Die Mikrosomensuspension wurde in Portionen zu 1 ml geteilt und weiterverarbeitet.

2.5. Bestimmungsmethoden

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des mikrosomalen Proteins wurde die Biuret-Methode modifiziert nach BODE et al. (4) verwandt.

1.) 10 µl Mikrosomensuspension wurden mit 1 ml Aqua dest. und 0.2 ml 3 m Trichloressigsäure 5 Minuten lang mit einem Rotationsmischer gemischt und 1 - 2 Minuten lang mit einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) bei 16.000 Upm zentrifugiert.

2.) Das Sediment wurde mit 0.5 ml Biuret-Reagenz und 0.5 ml Aqua bidest. versetzt und 30 Minuten lang gemischt.

3.) Die Extinktion wurde gegen Aqua dest. bei Zimmertemperatur auf einem Photometer (Eppendorf-Photometer 1011 M; Wellenlänge: 546 nm; Blendenweite: 1 mm; Absaugküvette mit 0.5 ml Volumen; Schichtdicke: 2 cm) abgelesen (Leerwert: 0.5 ml Aqua dest. und 0.5 ml Biuret-Reagenz).

4.) Nach dem Ablesen wurde der Rest der Probe mit 50 µl Kaliumcyanid-Lösung entfärbt, 1 - 2 Minuten lang gemischt und die Extinktion erneut abgelesen.

Cytochrom P 450

Zur Bestimmung des Cytochrom P 450 wurde die Methode nach OMURA und SATO (27) in Abänderung nach SCHOENE et al. (40) verwandt:
Nach Verdünnung der Mikrosomensuspension auf 1 mg Protein/ml wurden in jede Küvette 2.0 ml pipettiert. Nach Zugabe von einigen Körnchen Dithionit in die Meßküvette wurde diese 30 Sekunden lang mit Kohlenmonoxid begast und verschlossen. Die Vergleichsküvette wurde nur begast und verschlossen. Das Differenzspektrum wurde mit einem Spektralphotometer (Zeiss DMR 21) geschrieben. Die Berechnung des Cytochrom P 450 -Gehaltes erfolgte unter Verwendung eines millimolaren Extinktionskoeffizienten von 91 cm^{-1} (Cytochrom $P_{450-490}$ nm) (27) nach der Formel:

Extinktion x Verdünnung x Proteingehalt/0.091.

Die 100 %ige Ausbeute an mikrosomalem Protein wurde nach GREIM et al. (13) aus dem Cytochrom P_{450}-Gehalt in Homogenat und Mikrosomen errechnet.

NADPH-Cytochrom c Reduktase (EC 1.6.2.3.)

Für die Bestimmung der NADPH-Cytochrom c Reduktase wurde der Test nach MASTERS et al. (24) verwandt:
Zu 1.49 ml m/15 Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7.5) wurden 0.2 ml KCN-Lösung (6.5 mg/10 mlPuffer), 0.2 ml Cytochrom-c-Lösung (30 mg/2 ml Puffer) und 0.01 ml Mikrosomensuspen-

sion (ca. 1 mg Protein/ml) pipettiert. Nach Zusatz von 0.1 ml NADPH-Lösung (10 mg/1 ml Puffer) wurde gegen Aqua dest. bei 546 nm 5 Minuten lang die Extinktionszunahme registriert.

Die Aktivitätszunahme der NADPH-Cytochrom c Reduktase wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des molaren Extinktionskoeffizienten von 7.7×10^6 cm^2/Mol nach MARGOLIASH (22) bei 546 nm aus der Extinktionsänderung/Min. errechnet und in µMol Substrat/Min./g Leber angegeben. Die Messung erfolgte bei 30 Grad Celsius in einem DP-Digital-Photometer der Fa. E. Leitz Wetzlar.

Glucose-6-Phosphatase

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde in Mikrosomen nach HARPER (15) bestimmt. Dazu wurden 20, 40 und 50 µl Mikrosomensuspension (10 mg mikros. Protein/ml) mit 200 µl frisch angesetzter Glucose-6-Phosphat-Lösung (121,5 mg Glucose-6-Phosphat-di-Natriumsalz ad 5 ml Imidazol/HCl 0.2 m pH 6.5) versetzt und mit Imidazol-Puffer ad 1.0 ml aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mikrosomen gestartet; der Ansatz wurde 15 Min. bei 37 °C im Schütteltherm ostaten inkubiert und danach durch Hinzufügen von 0.2 ml 25 % Trichloressigsäure gestoppt. Nach kurzem Schütteln und Zentrifugieren wurde 0.5 ml vom Überstand mit 5 ml Ammoniummolybdatlösung und 1.0 ml frisch angesetzter Reduktionslösung versetzt und 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde der Phosphatgehalt der Lösung nach FISKE und SUBBAROW (11) bei 691 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt.

Anhand von vorgegebenen Standardwerten aus einer Eichkurve (Abb.1) wurde dann der Phosphatgehalt berechnet.

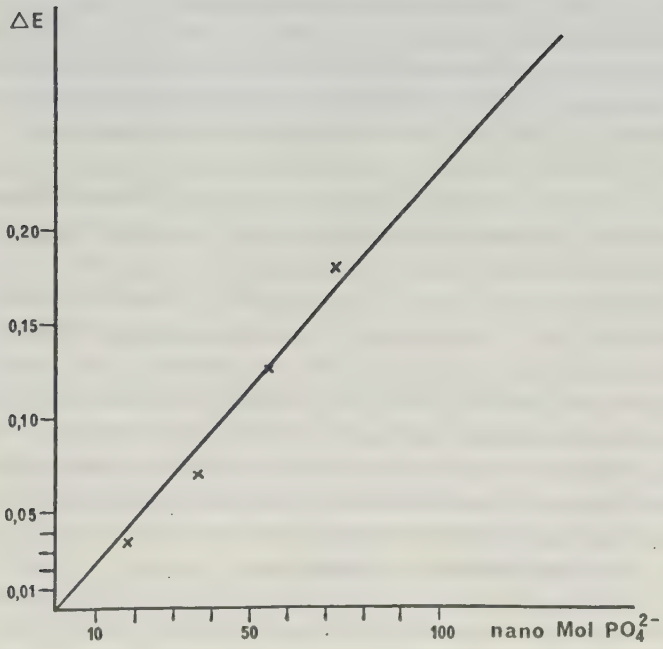

Abb.1: Eichkurve für die Glucose-6-Phosphatase, gemessen am Phosphatgehalt.

Phospholipide

1.) Extraktion der Phospholipide nach FOLCH et al. (12):
a) 1 ml der eingefrorenen Mikrosomensuspension wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut, mit 25 ml Extraktionsmittel (Chloroform/Methanol = 2/1 = V/V) homogenisiert, anschließend ca. 20 ml Extraktionsmittel hinzugefügt und 40 Minuten lang mittels Magnetrührer umgeschwenkt.
b) Die extrahierten Mikrosomen wurden erneut mit 25 ml und 15 ml Methanol/Chloroform extrahiert. Die vereinigten Filtrate umfaßten bei 90 ml Extraktionsmittel ca. 75 ml (Volumendifferenz entsprach der Verdampfung beim Extrahieren).
c) Nach Auffüllen der organischen Phase mit Extraktionsmittel auf 85 ml wurden 2.4 ml Aqua bidest. zur Sättigung (Sättigung lag bei 4 Vol.%) zugesetzt.
d) Zur Abtrennung von Nichtlipid-Phosphor wurde die organische Phase mit 17,5 ml 0.003 n Magnesiumchlorid-Lösung gewaschen.
e) Nach Phasentrennung (über 12 Stunden) im ungefetteten Scheidetrichter wurde das organische Lösungsmittel der Unterphase im Rotationsverdampfer bei 30 - 40 ^{o}C unter Wasserstrahlpumpenvakuum abgedampft. Der Destillationskolben wurde mit Stickstoff gefüllt und bis zur weiteren Aufarbeitung in einer Kühlzelle aufbewahrt.

2.) Dünnschichtchromatographische Trennung der extrahierten Phospholipide nach PARKER und PETERSEN (29):
a) Mit einem Desaga-Streichgerät wurden Glasplatten (20 x 20 cm) mit Kieselgel H (30 g Kieselgel (STAHL), Korndurchmesser: 10 - 40 µm; 58 ml Aqua bidest.) beschichtet (Schichtdicke: 0.2 mm) und vor Gebrauch ca. eine Stunde lang bei 110 ^{o}C aktiviert.
b) Die Lipide aus 1 ml Mikrosomensuspension (= 10 mg Protein) wurden in 2 ml Fließmittel (Chloroform/Methanol/Eisessig/Aqua bidest. = 25/15/4/2 = V/V/V/V) aufgenommen, gelöst und zu jeweils 2 x 10 µl und 2 x 20 µl auf die Kie-

selgelplatten aufgetragen.
Chromatographiedauer in mit Fließmittel (s.o.) gesättigter Desaga-Kammer: ca. 2 Stunden. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte in einer mit Joddampf gesättigten Kammer. Man erhielt eine Auftrennung der Phospholipide in sechs separate Flecke, einschließlich des Auftragungsflekkes (Verunreinigungen) und des Fleckes der Lösungsmittelfront (Neutralfette und Cardiolipin).

3.) Quantitative Bestimmung der getrennten Phospholipide über das Phosphat nach BARTLETT (2):
a) Nach Verdampfen des Jods wurden die markierten Flecken ausgekratzt und in Zentrifugen-Röhrchen überführt, so daß zwei Ansatzreihen mit 2 x 10 µl = 20 µl und 2 x 20 µl = 40 µl vorlagen. Die Leerwerte enthielten nur Kieselgel, die Standards 10 µl, 20 µl und 30 µl Dinatriumphenylphosphat.
b) Alle Proben wurden nach Zugabe von 0.5 ml 15 n Schwefelsäure für 3 Stunden bei 160 ^{o}C im Trockenschrank verascht, anschließend mit 2 bis 4 Tropfen 30 %igem Wasserstoffperoxid versetzt und bis zur Farblosigkeit aufgekocht.
c) Nach Addition von 4.6 ml 0.22 %iger Ammoniummolybdatlösung und 0.2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz wurden die Proben 10 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt und
d) nach 45 Minuten Abkühlung bei Zimmertemperatur (enthaltendes Kieselgel wurde abzentrifugiert) mittels eines Spektralphotometers (Zeiss PM Q II, 830 nm, rote Photozelle, Schlitzweite 0.018,d = 2 cm Glasküvetten OS) gegen Aqua bidest. colorimetriert.

Aminopyrindemethylase

Zur Bestimmung der Aktivität der Aminopyrindemethylase wurde die Methode nach BRODIE und AXELROD (5) verwandt:

a) Zunächst wurde ein generierendes System hergestellt: 61.00 mg $MgCl_2$, 705.90 mg Isocitrat und 82,65 mg NADP wurden mit Tris-HCl-Puffer (pH = 7.5) auf 98 ml aufge-

füllt, dazu wurden 2 ml Isocitratdehydrogenase hinzugefügt.
b) 1 ml generierendes System, 1 ml Mikrosomensuspension (= 3 mg Protein/ml) und 1 ml 10 m M Aminopyrin (693 mg Aminopyrin/100 ml H_2O) wurden 6 Minuten lang im Erlenmeyerkolben und Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert.
c) Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt.
d) Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 5 Minuten lang bei 6000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.
e) 1.5 ml des Überstandes wurde mit 1.5 ml Nash-Reagenz (= 150 g Ammoniumacetat, 3 ml 96 %ige Essigsäure und 2 ml Acetylaceton ad 1 l H_2O) versetzt. Dieses Gemisch wurde 8 Minuten lang bei 58 °C im Wasserbad inkubiert, nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die Farbreaktion bei 412 nm im Zeiss-Spektralphotometer PM Q II gemessen.
Für die Leerwerte wurden den Ansätzen statt Aminopyrin H_2O zugesetzt.
f) Anhand von vorgegebenen Standardwerten aus einer Eichkurve wurde dann der HCHO-Gehalt berechnet.

Anilinhydroxylase

Die Aktivität der Anilinhydroxylase wurde mit der Methode nach SCHENKMANN et al. (38) bestimmt.

a) Zunächst wurde ein generierendes System hergestellt: 61.00 mg $MgCl_2$, 705.90 mg Isocitrat und 82,65 mg NADP wurden mit Tris-HCl-Puffer (pH = 7.5) auf 98 ml aufgefüllt, dazu wurden 2 ml Isocitratdehydrogenase hinzugefügt.
b) 1 ml generierendes System, 1 ml Mikrosomensuspension (= 3 mg Protein/ml) und 1 ml 1 m M Anilin (= 1.37 ml Anilin ad 500 ml H_2O = 10 m M Anilin). Von dieser Lösung wurden 10 ml (ad 100 ml H_2O = 1 m M Anilin) 14 Minuten lang im Erlenmeyerkolben und Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert.
c) Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 20 %iger Trichloressigsäure gestoppt.

d) Anschließend wurde das gesamte Reaktionsgemisch 5 Minuten lang bei 6000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.
e) 1.0 ml des Überstandes wurde mit 1 ml 1 M Na_2CO_3 und 1.0 ml 0.5 M Phenolreagenz (= 250 ml 1 N NaOH und 25 g Phenol ad 500 ml H_2O) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Zimmertemperatur wurde die Farbreaktion bei 630 nm im Zeiss-Spektralphotometer PM Q II gemessen. Für die Leerwerte wurden den Ansätzen statt Anilin H_2O zugesetzt.
f) Anhand von vorgegebenen Standardwerten aus einer Eichkurve wurde dann der PAP^+-Gehalt berechnet.

2.6. Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Standardabweichungen stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar (SE), errechnet nach der Formel

$$\text{Sigma } \bar{x} = \frac{\text{Sigma}}{\sqrt{n}} .$$

Die Signifikanzbestimmung erfolgte mit dem t-Test nach Student. Für Rechenvorgänge wurde der Wang-Kleincomputer Modell 720 C verwendet.

+ PAP = Para-aminophenol

3. ERGEBNISSE

Werden körpereigene Organe von der Blutzufuhr abgeschnitten, so kommt es infolge Sauerstoffmangels zur Nekrose. Dieses dürften auch die ersten Zeichen sein, die postmortal als Folge der mangelnden Blutzufuhr auftreten. In der Leber werden im weiteren Verlauf Lysosomen freigesetzt, die ihrerseits nach Ausströmen der in ihnen enthaltenen Enzyme zur Selbstverdauung des Organs führen. Die Autolyse der Rattenleber zeigt nach 6 Stunden bei Zimmertemperatur und Lichtabschluß in einem Feuchtigkeitsmilieu eine dunkelbraune Färbung, die nach einer 24stündigen Autolyse in eine schwarzbraune Färbung übergeht. Dabei wird das Organ weich und zerfließlich.

Geht man davon aus, daß das in der Leberzelle geordnet vorliegende endoplasmatische Retikulum von diesem Autolyseprozeß in der Anfangsphase betroffen wird, so ist es vorstellbar, daß zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Desorganisation des endoplasmatischen Retikulums auftritt und damit verbunden ein Aktivitätsanstieg bestimmter Enzyme. Dieser Aktivitätsanstieg wäre denkbar für die UDP-Glucuronyltransferase, die bei den in üblicher Weise hergestellten Mikrosomen offenbar nicht frei an der Oberfläche liegt, da nach Ultraschallbehandlung und damit nach einer räumlichen Umwandlung der Mikrosomenvesikel eine höhere Aktivität nachweisbar ist. Umgekehrt ist auch ein Aktivitätsverlust denkbar, der auf einer Änderung der sterischen Konfiguration durch das Angreifen von lysosomalen Enzymen bedingt ist und zu einer Inaktivierung eines Enzyms führen könnte.

Da mikrosomale Enzymaktivitäten der menschlichen Leber aus Mangel an verfügbarem Untersuchungsmaterial nur unter großen Schwierigkeiten gemessen werden können, soll untersucht werden, wieweit es innerhalb eines definierten Zeitraumes zu einem Aktivitätsverlust oder Aktivitäts-

anstieg bestimmter Enzyme kommt. Diese Untersuchungen sollen zunächst an tierischer Leber durchgeführt und später an menschlicher Leichenleber überprüft werden.

3.1. Tierversuche

3.1.1. Mikrosomales Protein

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen, sind ältere schwere Tiere zu den Untersuchungen herangezogen worden, damit eine ausreichende Lebergröße und damit genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht. Die etwa 1 Pfund schweren Ratten weisen dabei ein relatives Lebergewicht von etwa 3 g auf. Die hier durchgeführten Messungen sind demnach nur für alte Tiere gültig und können daher nicht mit den Aktivitäten mikrosomaler Enzyme bei jungen Ratten verglichen werden (Tab.1).

Tab.1: Körpergewicht, Lebergewicht und mikrosomaler Proteingehalt von Rattenlebern (n=6) zum Zeitpunkt 0 und nach 6- sowie 24stündiger Autolyse (MW ± SE).

	n	6	p
	KG (g)	515 ± 10,6	
	rel.LG (g)	3 ± 0,03	
0 h	$\frac{\text{mg mikr.Prot.}}{\text{100 g KG}}$	100 ± 9,5	
6 h	$\frac{\text{mg mikr.Prot.}}{\text{100 g KG}}$	77 ± 3,8	< 0,05
24 h	$\frac{\text{mg mikr.Prot.}}{\text{100 g KG}}$	61 ± 2,3	< 0,05

Der mikrosomale Proteingehalt bezogen auf das Körpergewicht zeigt eine deutliche Abnahme nach 6 Stunden. Auch nach 24 Stunden ist eine weitere Abnahme zu verzeichnen. Ursache

für diese Mengenabnahme dürfte der Waschvorgang durch das insgesamt viermalige Zentrifugieren sein, durch den autolysierte Proteine herausgelöst und verworfen werden, so daß zum Schluß der Zentrifugation nur noch etwa zwei Drittel der mikrosomalen Vesikel als enzymatisch aktiv angesehen werden können.

Durch die der Autolyse folgende Zentrifugation wird natürlich neben Enzymproteinen auch Cytochrom P 450 inaktiviert. Da Cytochrom P 450 als Bezugsgröße für den Proteinverlust während der Zentrifugation herangezogen wird, ist eine Aussage von Enzymaktivitäten bezogen auf Körpergewicht oder Lebergewicht nicht möglich, wenn berücksichtigt wird, daß der Bezugsparameter als solcher sich selbst ändert.

3.1.2. Mikrosomale Enzymaktivitäten

Unter Berücksichtigung dieser methodischen Schwierigkeiten sind lediglich Parameter aussagekräftig, bei denen das Bezugssystem direkt meßbar ist, wie es z.B. bei dem Bezugssystem mikrosomales Protein möglich ist. Danach führt eine Autolyse nach 6 und nach 24 Stunden zu einem Abfall des Cytochrom P 450-Gehaltes bezogen auf mikrosomales Protein.

Auch die als mikrosomales Leitenzym gemessene NADPH-Cytochrom c Reduktase zeigt nach 6 und 24 Stunden gegenüber dem 0-Wert einen deutlichen Abfall der Aktivität.

Tab.2: Mikrosomaler Cytochrom P 450-Gehalt sowie mikrosomale Enzymaktivitäten[1] von Rattenlebern (n=6) zum Zeitpunkt 0 und nach 6- und 24stündiger Autolyse (MS ± SE) sowie Prozent der Ausgangsaktivität.

	0 h	6 h	p	%	24 h	p	%
n Mol Cyt.P 450 / mg mikr. Prot.	0,65 ± 0,07	0,35 ± 0,03	< 0,025	54	0,44 ± 0,02	< 0,05	68
NADPH-Cytochrom c Reduktase	125 ± 13	81 ± 5	< 0,05	65	98 ± 3	< 0,1	78
Glucose-6-Phosphatase	1173 ± 59	673 ± 70	< 0,01	57	510 ± 35	< 0,01	43
Aminopyrin-N-Demethylase	2,86 ± 0,19	2,61 ± 0,19	< 0,10	91	3,36 ± 0,28	< 0,10	117
Anilinhydroxylase	0,72 ± 0,11	0,55 ± 0,10	n.s.	76	0,60 ± 0,05	n.s.	83

1) Enzyme:
1.) NADPH-Cytochrom c Reduktase (nano Mol Substrat/min x mg mikros.Prot.)
2.) Glucose-6-Phosphatase (nano Mol Substrat/min x mg mikros.Prot.)
3.) Aminopyrin-N-Demethylase (nano Mol Formaldehyd/min x mg mikros.Prot.)
4.) Anilinhydroxylase (nano Mol p-aminophenol/min x mg mikros.Prot.)

3.1.3. Fremdstoffabbau

Das Fremdstoffe abbauende Enzymsystem der Leber ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Funktionen Demethylierung gemessen an der Aminopyrin-Demethylase und die Hydroxylierung, gemessen an der Anilin-Hydroxylase, zeigen ein unterschiedliches Verhalten. Während die Anilin-Hydroxylase einen nur geringen, nicht signifikanten Abfall der Aktivität zeigt, weist die Aminopyrin-Demethylase nach 6 Stunden einen deutlichen Abfall und nach 24 Stunden einen ausgeprägten Anstieg der Aktivität über den Ausgangswert hinaus auf. Auch die zuvor gemessene NADPH-Cytochrom c-Reduktase sowie das Cytochrom P 450 zeigen ein ähnliches Bewegungsmuster: Zunächst nach 6 Stunden deutlicher Abfall der Aktivität bzw. des Cytochrom P 450-Gehaltes; nach 24 Stunden ein Wiederanstieg, der jedoch nur bei der Aminopyrin-Demethylase die Aktivität des 0-Wertes übersteigt. Lediglich die Glucose-6-Phosphatase weist nach 6 Stunden und auch noch nach 24stündiger Autolyse eine weitere Abnahme der Aktivität auf.

Die Einzelwerte sind in den Tabellen 3 bis 5 aufgelistet.

Tab.3: Einzelwerte des mikrosomalen Cytochrom P 450-Gehaltes sowie mikrosomaler Enzymaktivitäten[1] in Rattenlebern zum Zeitpunkt 0 (MW ± SD ± SE).

n	Cyt. P 450	NADPH-Cyt. c Reduktase	Glucose-6-Phosphatase	Aminopyrin-N-Demethylase	Anilin-hydroxylase
1	0,80	133	1258,12	2,7	0,4
2	0,78	142	1262,70	2,5	0,4
3	0,61	112	1258,12	2,7	0,7
4	0,79	149	1262,70	2,7	0,9
5	0,35	68	924,15	2,8	0,9
6	0,59	145	1070,55	3,8	1,0
MW	0,65	125	1172,72	2,9	0,72
±	0,18	30,81	143,53	0,48	0,26
±	0,07	12,57	58,59	0,19	0,11

1) s. Anmerkung Tab.2

Tab.4: Einzelwerte des mikrosomalen Cytochrom P 450-Gehaltes sowie mikrosomaler Enzymaktivitäten[1)] in Rattenlebern nach 6stündiger Autolyse (MW ± SD ± SE).

n	Cyt. P 450	NADPH-Cyt. c Reduktase	Glucose-6-Phosphatase	Aminopyrin-N-Demethylase	Anilin-hydroxylase
1	0,30	77	398,29	2,1	0,3
2	0,42	87	796,58	2,5	0,3
3	0,30	77	608,20	2,5	0,5
4	0,34	80	629,73	2,7	0,6
5	0,30	67	710,47	2,4	0,6
6	0,46	100	893,47	3,5	1,0
MW	0,35	81,33	672,79	2,61	0,55
±	0,07	11,18	171,35	0,47	0,25
±	0,03	4,56	69,95	0,18	0,10

1) s. Anmerkung Tab.2

Tab.5: Einzelwerte des mikrosomalen Cytochrom P 450-Gehaltes sowie mikrosomaler Enzymaktivitäten[1)] in Rattenlebern nach 24stündiger Autolyse (MW ± SD ± SE).

n	Cyt. P 450	NADPH-Cyt. c Reduktase	Glucose-6-Phosphatase	Aminopyrin-N-Demethylase	Anilin-hydroxylase
1	0,37	93	427,00	2,8	0,6
2	0,41	93	427,00	3,7	0,4
3	0,47	114	653,57	2,7	./.
4	0,44	101	549,00	3,8	0,7
5	0,45	93	483,64	2,8	0,6
6	0,48	97	518,50	4,4	0,7
MW	0,44	98,5	509,78	3,36	0,6
±	0,04	8,24	85,64	0,70	0,1
±	0,01	3,36	34,96	0,28	0,05

1) s. Anmerkung Tab.2

3.1.4. Korrelationen

Betrachtet man die Beziehung des Cytochrom P 450-Gehaltes zu den einzelnen Enzymaktivitäten, so findet sich eine gute Korrelation für die mikrosomalen Leitenzyme Cytochrom c Reduktase und Glucose-6-Phosphatase. Dagegen weist die Aminopyrin-Demethylase keine Beziehung zum Cytochrom P 450-Gehalt auf und die Hydroxylierung von Anilin nur eine mittlere (siehe Tab.6).

Dieses Verhältnis ist auch noch nach 6 Stunden gegeben (s. Tab.7), wobei jetzt jedoch die Aktivität der Demethylierung offensichtlich mit dem Cytochrom P 450-Gehalt in Zusammenhang steht.

Nach 24 Stunden (Tab.8) besteht offensichtlich wiederum kein Zusammenhang der Demethylierung mit dem Cytochrom P 450-Gehalt. Auch die Cytochrom c Reduktase und die Anilinhydroxylierung weisen nur noch einen Korrelationskoeffizienten von 0,5 auf. Lediglich die Glucose-6-Phosphatase-Aktivität zeigt nach wie vor eine Abhängigkeit vom Cytochrom P 450-Gehalt.

Überträgt man die Einzelwerte von Cytochrom P 450-Gehalt und Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase in ein Koordinatensystem, so zeigt sich, daß zum Zeitpunkt 0 und nach 6 Stunden eine gute Korrelation, jedoch nach 24 Stunden nur eine mittlere Korrelation nachweisbar ist (siehe Abb.2).

Werden alle Einzelwerte zusammengenommen (Abb.3), so ergibt sich eine direkte gegenseitige Abhängigkeit zwischen Cytochrom P 450-Gehalt und Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase.

Eine vergleichbare Abhängigkeit vom Cytochrom P 450-Gehalt weist die Glucose-6-Phosphatase über den genannten Zeitraum hin auf (Abb.4).

Tab.6: Korrelationsfaktoren der mikrosomalen Enzymaktivitäten aus Rattenlebern zum Cytochrom P 450 zum Zeitpunkt 0.

	NADPH-Cyt. c Reduktase	Glucose-6-Phosphatase	HCHO	PAP
	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.
Cyt. P 450 / mg mikr. Prot.	r = 0,86	r = 0,90	r = - 0,29	r = - 0,57

Tab.7: Korrelationsfaktoren der mikrosomalen Enzymaktivitäten aus Rattenlebern zum Cytochrom P 450 nach 6stündiger Autolyse.

	NADPH-Cyt. c Reduktase	Glucose-6-Phosphatase	HCHO	PAP
	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.
Cyt. P 450 / mg mikr. Prot.	r = 0,93	r = 0,81	r = 0,80	r = 0,50

Tab.8: Korrelationsfaktoren der mikrosomalen Enzymaktivitäten aus Rattenlebern zum Cytochrom P 450 nach 24stündiger Autolyse.

	NADPH-Cyt. c Reduktase	Glucose-6-Phosphatase	HCHO	PAP
	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.
Cyt. P 450 / mg mikr. Prot.	r = 0,55	r = 0,75	r = 0,32	r = 0,55

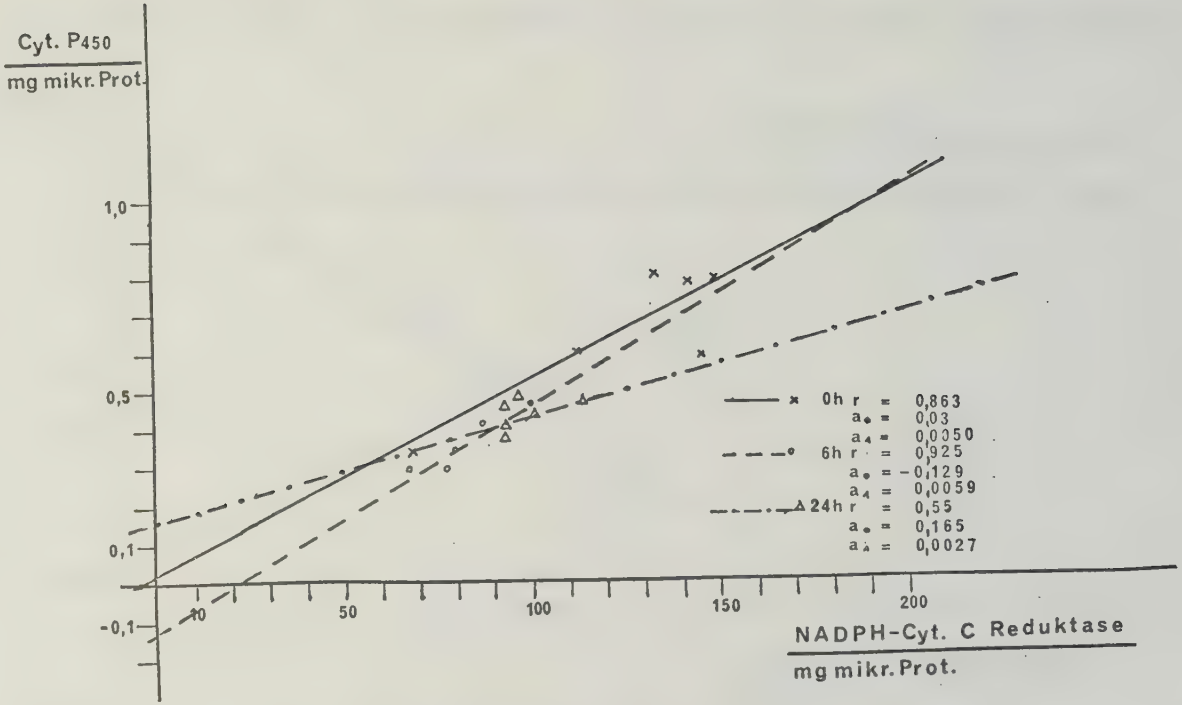

Abb.2: Korrelationen der NADPH-Cytochrom c Reduktase zum Cytochrom P 450 in Rattenlebermikrosomen zum Punkt 0 und nach 6- sowie 24stündiger Autolyse.

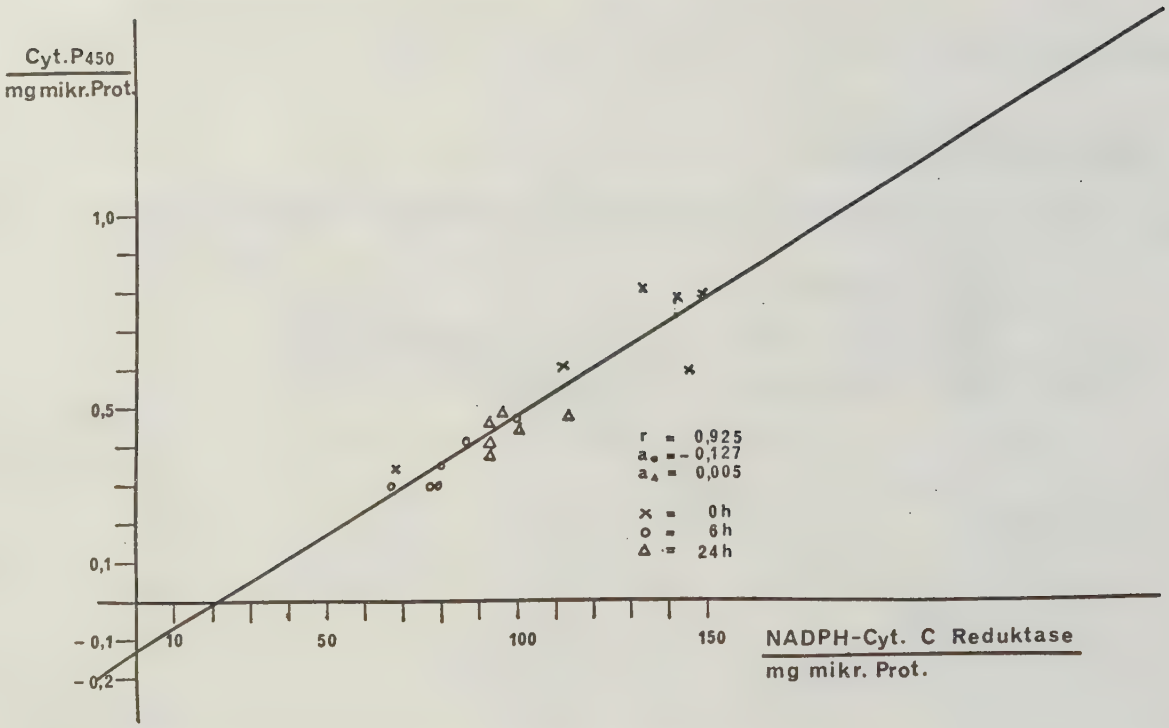

Abb.3: Gesamtkorrelation der NADPH-Cytochrom c Reduktase zum Cytochrom P 450 in Rattenlebermikrosomen.

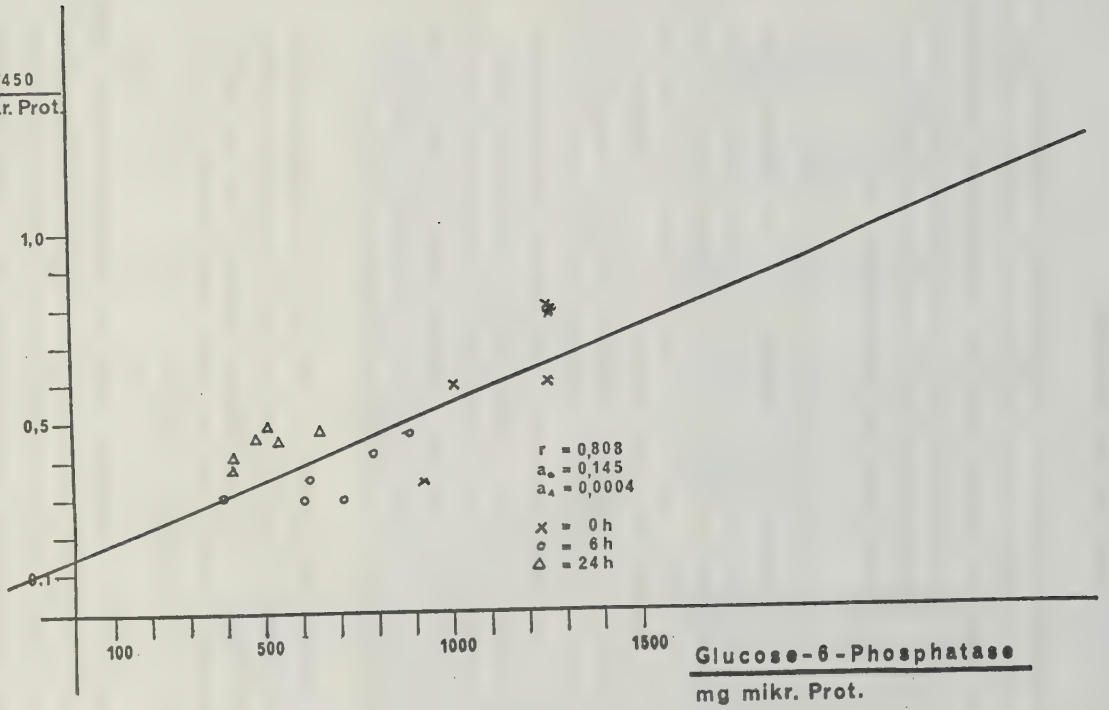

Abb.4: Gesamtkorrelation der Glucose-6-Phosphatase zum Cytochrom P 450 in Rattenlebermikrosomen.

3.2. Untersuchungen an Leichenlebern

Untersuchungen wurden an 9 Leichenlebern durchgeführt. Es handelte sich um Patienten, die im Alter zwischen etwa 30 und 60 Jahren an unterschiedlichen Erkrankungen verstorben waren. Die untersuchten Lebern wiesen histologisch wenigstens eine Leberverfettung auf, lediglich der Patient F.W. zeigte histologisch normales Lebergewebe (Tab.9).

Die präfinal abgenommenen Laborparameter - SGOT und SGPT - zeigten keine wesentliche Erhöhung über die Norm, so daß zumindest 24 Stunden präfinal massive Läsionen der Leber nicht vorgelegen haben dürften. Im Tierexperiment ist die Funktion der Leber auch bei einer Fettleber (14) bzw. bei einer Cholestase (34) nicht wesentlich eingeschränkt. Die Mikrosomen, die postmortal gewonnen wurden, zeigen teilweise eine Reduktion des Cytochrom P 450-Gehaltes. Schlüsselt man die Patienten nach vorbestehender Schocksymptomatik (Blutdruckabfall, Sistieren der Urinausscheidung über mindestens 12 h präfinal) auf, so zeigt sich, daß der Cytochrom P 450-Gehalt bei Schockpatienten im Mittel bei 0,23 nMol liegt, während Patienten ohne Schock einen Cytochrom P 450-Gehalt von 0,44 nMol aufweisen (Tab.12).

Über den Phospholipidgehalt menschlicher Lebermikrosomen liegen bisher keine Erkenntnisse vor, verglichen jedoch mit dem Gehalt von Rattenlebermikrosomen (ca. 800 nmol/mg mikrosomales Protein) zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede im Gesamtgehalt (Tab.10).

Wie aus Tab.11 zu ersehen, liegt die mikrosomale Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase in einem Bereich zwischen 27 und 88 nmol, lediglich der Patient J.B., der auch den höchsten mikrosomalen Proteingehalt pro g Leber aufweist, zeigt eine vermehrte Aktivität. Eventuell dürfte bei diesem Patienten vermehrtes Enzymprotein vorgelegen haben.

Tab.9: Alter, Körpergewicht, Lebergewicht, Diagnose und Leberhistologie der verstorbenen Patienten[1)]

Patient	Alter	KG	LG	Diagnose	Leberhistologie
J.B. ♂	60 J.	78 kg	1880 g	Essentielle Hypertonie Koronarsklerose	diskrete Verfettung wenig Einzelzellnekrosen
J.P. ♂	59 J.	74 kg	1900 g	Hypertonie Diabetes mellitus Arteriosklerose	zentrale mittel- bis großtropfige Verfettung Megakariozyten
L.Sch.♀	56 J.			Unreifzellige Leukose	
K.M. ♂	29 J.	88 kg	2750 g	Mastoiditis eitrige Bronchitis nekrotisierende Glomerulonephritis	großtropfige Verfettung zentrale Cholestase Leberzellnekrosen
K.B. ♂	41 J.	80 kg	2200 g	Agranulozytose Meningitis spinalis Sepsis	diskrete großtropfige Verfettung leichte periportale Fibrose leichte Schockleber
R.R. ♂	45 J.	57 kg	2400 g	Leberzirrhose Pankreatitis	mittel- bis großtropfige Verfettung, periportale Fibrose Cholestase
F.W. ♂	60 J.	68 kg	1800 g	Essentielle Hypertonie Zerebrale Massenblutung Lobärpneumonie	normales Lebergewebe
L.F. ♂	60 J.	83 kg	1650 g	Essentielle Hypertonie Nierenversagen Lungenembolie	diskrete Cholestase hepatozelluläres Eisen einige Lochkerne in der Peripherie
A.K. ♂	38 J.	60 kg	1800 g	Beginnende Leberzirrhose Myokardhypertrophie Großhirnrindenprellung	gemischttropfige Verfettung alkoholische Zirrhose Riesenmitochondrien

1) Herrn Prof. Dr. H. W. Altmann danke ich für die Genehmigung zur postmortalen Leberpunktion und für die Einsichtnahme in die Sektionsprotokolle. Herrn Privatdozent Dr. W. Romen danke ich für die histologische Begutachtung der Leichenlebern.

Tab.10: Präfinale Transaminasenaktivitäten sowie mikrosomaler Protein-, Cytochrom-P 450- und Gesamtphospholipidgehalt in menschlicher Leichenleber.

Patient	SGOT (U/l)	SGPT (U/l)	mg mikr. Prot. / g Leber	n Mol Cyt. P 450 / mg mikr. Prot.	Ges.PL-Gehalt n Mol Phosphat / mg mikr. Prot.
J.B.	10	12	19,2	0,51	527
J.P.	24	12	6	0,41	1357
L.Sch.	50	12	4,9	0,13	./.
K.M.	36	68	5,4	0,33	852
K.B.	16	30	6,1	0,23	656
R.R.	18	12	5,8	0,15	1019
F.W.	42	20	3,8	0,40	./.
L.E.	16	22	./.	0,54	./.
A.K.	26	16	./.	./.	./.

Tab.11: Mikrosomaler Cytochrom P 450-Gehalt und NADPH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität in menschlicher Leichenleber sowie Zeitpunkt der Leberpunktion.

Patient	n Mol Cyt.P 450	n Mol NADPH Cyt. c Reduktase	Zeitpunkt der Leberpunktion (in Stunden)
	mg mikr. Prot.	mg mikr. Prot.	post mortem.
J.B.	0,51	266	0,5
J.P.	0,41	41	0,5
L.Sch.	0,13	61	0,5
K.M.	0,33	88	0,75
K.B.	0,23	68	1
R.R.	0,15	27	1
F.W.	0,40	80	1
L.F.	0,54	77	1,5
A.K.	-	70	3,5

Tab.12: Cytochrom P 450-Gehalt in menschlicher Leichenleber bei Patienten mit präfinal stabilen Kreislaufverhältnissen sowie bei Patienten mit mindestens 12 h präfinal anhaltender Schocksymptomatik.

Schock: nein		Schock: ja		
Patient	n Mol Cyt.P 450	Patient	n Mol Cyt.P 450	
	mg mikr. Prot.		mg mikr. Prot.	
J.B.	0,51	J.P.	0,41	
K.M.	0,33	L.Sch.	0,13	
F.W.	0,40	K.B.	0,23	
L.F.	0,54	R.R.	0,15	
MW	0,445	MW	0,23	
± SE	0,049	± SE	0,06	$P < 0,05$

Versucht man eine Beziehung zwischen dem Cytochrom P 450-Gehalt und der Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase pro mg mikrosomales Protein herzustellen, so zeigt sich eine mäßige Korrelation mit einem Korrelationsfaktor von $r = 0,53$ (Abb.5).

Somit kann davon ausgegangen werden, daß bis etwa 3,5 Stunden postmortal beim Menschen noch funktionsfähiges Lebergewebe gewonnen werden kann, wobei die Aussagefähigkeit zu untersuchender Enzymaktivitäten jedoch von der gleichzeititen Bestimmung von Leitparametern abhängig ist.

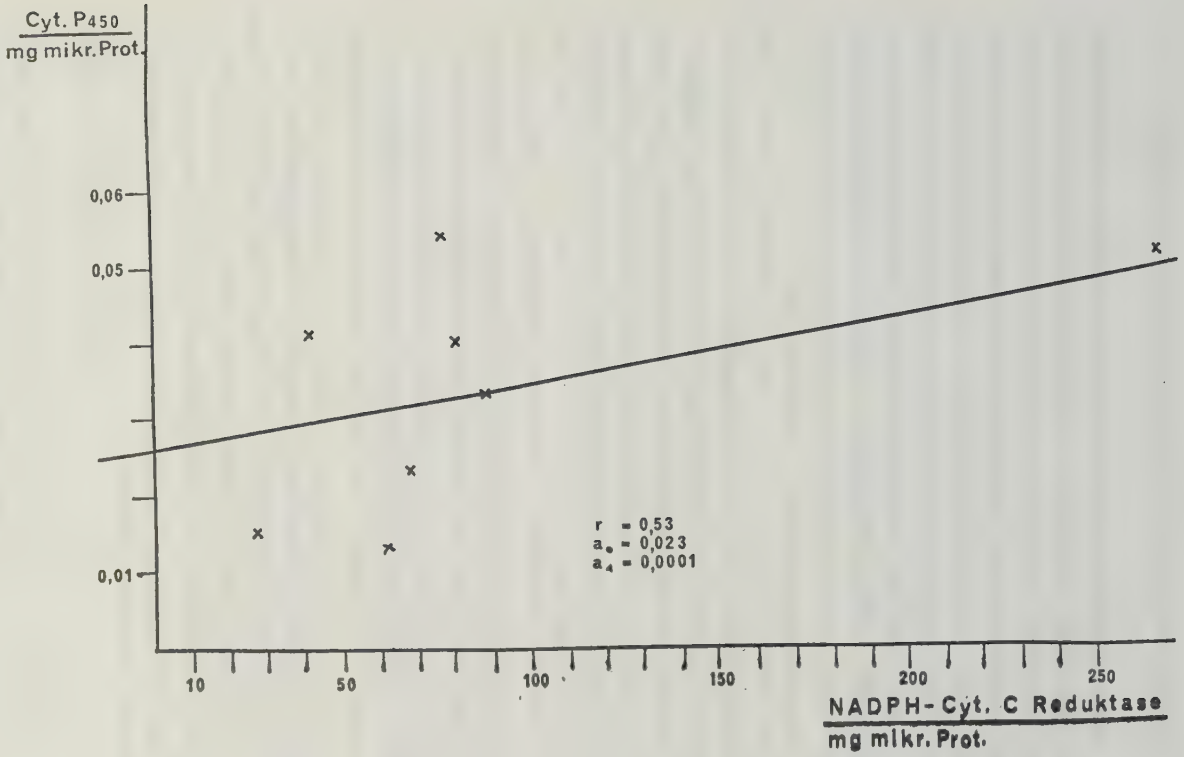

Abb.5: Korrelation der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c Reduktase zum Cytochrom P 450 in menschlicher Leichenleber.

4. DISKUSSION

Der Arzneimittelumsatz der menschlichen Leber kann mit direkten Methoden nur schwer gemessen werden, da aus ethischen Gründen eine Gewinnung ausreichender Mengen von Untersuchungsmaterial, z.B. durch eine Leberpunktion, nicht möglich ist. Bisher ist lediglich durch SOTANIEMI (41) eine Untersuchung der Korrelation zwischen Cytochrom P 450-Gehalt und der Antipyrin-Clearance in Leberpunktionszylindern geprüft worden. Weitere, gleichzeitige Untersuchungen am gleichen Punktionszylinder waren wegen der geringen Mengen Untersuchungsmaterial nicht möglich.

Als Ausweg bietet sich für den Menschen bisher daher nur die Untersuchung von Leichenleber an. Um aus den gewonnenen Meßergebnissen jedoch relevante Schlußfolgerungen treffen zu können, ist es notwendig, über die Geschwindigkeit postmortal auftretender Veränderungen durch Autolyse Aufschluß zu erhalten.

Es war daher das Ziel dieser Arbeit, zunächst im Rahmen eines Tierversuchs die Funktion autolytischer Leber zum Zeitpunkt Null, nach 6- und nach 24stündiger Autolyse zu prüfen. Als Untersuchungsparameter für die Struktur dienten einmal Cytochrom P 450 und das mikrosomale Protein als Bausteine der mikrosomalen Membran, als Parameter für die Funktion enzymatischer Aktivitäten die Glucose-6-Phosphatase und die NADPH-Cytochrom c Reduktase und für die arzneimittelabbauende Funktion die Anilin-Hydroxylase und die Aminopyrin-Demethylase. Die gewonnenen Daten können dann mit Werten verglichen werden, die an der menschlichen Leichenleber gemessen wurden.

4.1. Mikrosomales Protein und Cytochrom P 450

Der aus Tabelle 1 zu ersehende Abfall des mikrosomalen Proteins steht in Übereinklang mit der von RIEDE (36) gemachten Beobachtung, daß nach einstündiger Autolyse die Oberfläche der Ribosomen-besetzten und granulierten Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums um 50 % kleiner geworden ist. Die freien Ribosomen finden sich im Cytoplasma und werden daher bei der Zentrifugation nicht sedimentiert, so daß sie bei der Proteinbestimmung nicht miterfaßt werden.

Da dieses mikrosomale Protein für weitere Bestimmungen das Bezugssystem bildet, kann einmal die Aktivität mikrosomaler Enzyme verringert sein, wenn man von einer Verringerung bzw. Veränderung des Enzymproteins ausgeht. Zum anderen wäre jedoch auch eine Steigerung der Enzymaktivität denkbar, wenn z.B. das Enzymprotein unverändert aktiv bliebe und sich lediglich das Bezugssystem - hier eine Verringerung des mikrosomalen Proteins - verändert. Da bei einem Bezug auf g Leber oder Körpergewicht durch die Autolyse bedingte Änderungen in das Bezugssystem nicht miteingehen, wird darauf verzichtet, diese Werte anzugeben. Es zeigt sich jedoch dabei ein Anstieg sämtlicher Enzymaktivitäten sowohl nach 6- als auch nach 24stündiger Autolyse.

Die Verringerung des Cytochrom P 450 ist sicherlich durch die Autolyse bedingt. Welche Mechanismen hier jedoch ansetzen, ob z.B. lysosomale Enzyme eine Inaktivierung bewirken, kann mit diesen Methoden nicht untersucht werden.

4.2. Mikrosomale Enzyme

Das mikrosomale Leitenzym NADPH-Cytochrom c Reduktase zeigt in seiner Aktivität nach 6 und 24 Stunden einen deutlichen Abfall. Es kann davon ausgegangen werden, daß

dieses Enzym als Enzymprotein auf der mikrosomalen Membran lokalisiert ist und durch den Autolyseprozeß entweder aus seinem Zusammenhang herausgelöst oder in seiner sterischen Anordnung gestört wird. Auch die Glucose-6-Phosphatase, die ebenfalls am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, weist eine Abnahme der Aktivität auf. Zum Unterschied zur NADPH-Cytochrom c Reduktase jedoch, die nach 24stündiger Autolyse einen geringen Wiederanstieg der Aktivität aufweist, zeigt die Glucose-6-Phosphatase-Aktivität nach 24stündiger Autolyse einen weiteren Aktivitätsverlust. Dieser Unterschied kann mit den verwendeten Methoden nicht erklärt werden. Denkbar wäre, daß nach 6stündiger Autolyse für beide Enzyme eine Änderung der sterischen Anordnung vorliegt, die nach weiterer Autolyse für die NADPH-Cytochrom c Reduktase zu einem vermehrten Freilegen von enzymatisch aktivem Protein und damit einem Aktivitätsanstieg führt, während es für die Glucose-6-Phosphatase zu einer vermehrten Desorganisation und damit zu einem weiteren Aktivitätsverlust kommt.

Dieser Mechanismus, der zur Auffaltung der Membran und damit zu einem vermehrten Freiliegen einer größeren Menge Enzymproteins führt, ist ebenso denkbar wie eine veränderte Kompartimentierung, wie sie von BERRY (3) für die UDP-Glucuronyl-Transferase diskutiert wird. Ein ähnliches Verhalten der UDP-Glucuronyl-Transferase findet sich auch bei schweren menschlichen Lebererkrankungen, bei denen im Gegensatz zur Aktivitätsminderung anderer Enzymsysteme die Glucuronidierung von Bilirubin auch bei stark erhöhten Werten sehr lange aufrechterhalten wird. Das unterschiedliche Korrelationsverhalten nach 0 h sowie nach 6- und 24stündiger Autolyse kann durch eine Dissoziation der Enzymaktivität und des noch vorhandenen Gesamt-Cytochrom P 450-Gehaltes erklärt werden, die einmal nach 6stündiger Autolyse deutlicher wird und nach 24stündiger Autolyse aufgrund der starken Schädigung ein verändertes Bild zeigt.

4.3. Arzneimittel-metabolisierendes Enzymsystem

Die unterschiedlichen Aktivitäten der Anilin-Hydroxylase mit einem geringen Abfall und der Aminopyrin-Demethylase mit einem deutlichen Abfall nach 6 Stunden und einem ausgeprägten Anstieg der Aktivität über den Ausgangswert hinaus lassen sich über den beschriebenen Mechanismus erklären. Von Interesse scheint jedenfalls zu sein, daß auch nach 24stündiger Autolyse das Fremdstoffe abbauende Enzymsystem der Leber noch funktioniert.

Die Beziehung zum Cytochrom P 450 erscheint hierbei nicht so deutlich zu bestehen wie für das mikrosomale Leitenzym NADPH-Cytochrom c Reduktase und die Glucose-6-Phosphatase, deren Aktivität Cytochrom P 450-unabhängig ist. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Untersuchungen von RICHTER et al. (35), nach denen z.B. für die Aktivität der Hexobarbital-Oxidase ein enger Zusammenhang mit dem Cytochrom P 450-Gehalt bei Patienten mit akuter Hepatitis besteht. KITAGAWA (19) fand nach 18stündiger Autolyse einen Abfall der Anilin-Hydroxylase auf etwa 1/5 der Aktivität ebenso wie für die Aktivität der Aminopyrin-Demethylase. Die Bildung Formaldehyd-ähnlicher Substanzen nach Zugabe von Cofaktoren steht hiernach jedoch nicht im Zusammenhang mit der Aktivität der arzneimittelabbauenden Enzyme.

MACLEOD und Mitarbeiter (21) beschreiben für die Kaninchenleber einen Abfall beider Enzyme auf etwa 25 % der Ausgangsaktivität nach 4,5 Stunden. Auch für die NADPH-Cytochrom c Reduktase und den Cytochrom P 450-Gehalt wird ein Abfall beschrieben. Die hier gewonnenen Werte sind natürlich nur mit Einschränkung vergleichbar mit Werten, die von Rattenleber gewonnen wurden. Außerdem ist bekannt, daß die Aktivität des arzneimittelabbauenden Enzymsystems von den jeweils verwendeten Substraten abhängig ist (LEADBETTER und DAVIS (20), JONDORF (17), CREAVEN und WILLIAMS (8).

BURCHELL und Mitarbeiter (6) weisen zunächst einen Abfall der UDP-Glucuronyl-Transferase-Aktivität, dann einen Anstieg der Aktivität nach. Dieser Anstieg kontrastiert zum kontinuierlichen Abfall der Hydroxylierungsaktivität.

Zusammenfassend kann für die untersuchten Parameter angegeben werden, daß es nach etwa 6stündiger Autolyse zu einem Abfall der Aktivitäten um 20 - 30 % kommt. Geht man davon aus, daß die extrakorporal in einem Feuchtigkeitsmilieu aufbewahrte Leber einem Autolyseprozeß bei einer Temperatur von 25 ^{o}C unterworfen ist, so muß für die Leichenleber bis zu einer Autolysedauer von etwa 6 Stunden eine höhere Aktivität der Autolyse angenommen werden, da die Leichenleber auch über längere Zeit hinaus nur einen geringeren Temperaturabfall unter 37 ^{o}C aufweist.

4.4. Untersuchungen an Leichenlebern

Berücksichtigt man die zuvor gemachten Einschränkungen, so lassen sich aus den an Leichenlebern durchgeführten Untersuchungen eigentlich nur folgende Aussagen machen:

1. Die Cytochrom P 450-Gehalte liegen in dem zu erwartenden Bereich von etwa 0,5 nmol/mg mikrosomales Protein.
2. Patienten mit präfinaler Schocksymptomatik weisen signifikant niedrigere Gehalte an Cytochrom P 450 auf.
3. Die Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase liegt ebenfalls in einem zu erwartenden Bereich.

Wesentliche Lebererkrankungen, die einen Einfluß auf die Aktivität bzw. den Gehalt der untersuchten Parameter hätten haben können, haben nicht vorgelegen.

Damit scheint eine Möglichkeit gegeben, den Arzneimittelstoffwechsel der menschlichen Leber genauer zu untersuchen und insbesondere die Funktion einer präfinal bereits geschä-

digten Leber zu prüfen. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich um Lebern von Patienten handeln kann, deren Kreislauf präfinal bereits darniedergelegen hat. Im Tierexperiment sind erste Veränderungen bereits eine Stunde postmortal elektronenmikroskopisch nachweisbar. Daher ist zu fordern, daß eine Biopsie so schnell als möglich postmortal vorgenommen wird und daß die Leber von Patienten stammt, die präfinal keine Schocksymptomatik aufweisen. Mit Mikrosomen solcher Lebern kann zum Beispiel der Abbau bzw. die Metabolisierung in evtl. stoffwechselaktive Abbauprodukte von neuen, noch nicht erprobten Pharmaka geprüft werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die Prüfung der enzymatischen Aktivität autolysierender Rattenleber als Modell sowie die Überprüfung einiger Parameter bei frischer menschlicher Leichenleber, da eine ausreichende Menge menschlicher Leber zur gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Parameter in vivo aus ethischen Gründen nicht zur Verfügung steht.

Dazu wurden 6 Rattenlebern in 3 Stücke aufgeteilt und sofort sowie nach 6- und 24stündiger Autolyse bei Zimmertemperatur und Dunkelheit verarbeitet. Nach Mikrosomenpräparation wurden mikrosomales Protein, Cytochrom P 450, NADPH-Cytochrom c Reduktase, Glucose-6-Phosphatase, Anilin-Hydroxylase und Aminopyrin-Demethylase bestimmt. Bei 9 Patienten wurde 0,5 - 3,5 h postmortal eine Leberpunktion durchgeführt und im gewonnenen Material mikrosomales Protein, Cytochrom P 450, NADPH-Cytochrom c Reduktase und z.T. Phospholipide gemessen.

Bei autolysierender Rattenleber wurde nach 6 Stunden bei allen Parametern ein Abfall auf 54 - 91 % der Ausgangsaktivität festgestellt. Nach 24stündiger Autolyse lag lediglich die Aktivität der Aminopyrin-Demethylase über der Ausgangsaktivität, die der übrigen Parameter zwischen Ausgangsaktivität und der Aktivität nach 6stündiger Autolyse, nur die Glucose-6-Phosphatase zeigte einen weiteren Abfall.

Die verstorbenen Patienten wiesen, soweit histologisch untersucht, bis auf einen Leberzellverfettungen auf. Biochemisch fand sich bei den Patienten, die mindestens 12 Stunden präfinal Zeichen einer Schocksymptomatik boten, ein reduzierter Cytochrom P 450-Gehalt gegenüber Patienten, deren Kreislaufverhältnisse stabil waren.

Diskutiert wird als Ursache eine unterschiedlich ausge-

prägte Schädigung für die einzelnen Enzymproteine nach 6-stündiger oder 24stündiger Autolyse. Für den Aktivitätsanstieg ist ein vermehrtes Freiliegen von Enzymprotein durch Schädigung der Nachbarbezirke bzw. eine veränderte sterische Konfiguration denkbar.

Es wird der Schluß gezogen, daß menschliche Leichenleber zur Prüfung noch nicht erprobter Pharmaka bedingt geeignet ist. Dazu sollten jedoch gesunde Lebern von Patienten verwendet werden, die präfinal ausreichende Kreislaufverhältnisse geboten haben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARKER, E.A.: Post-mortem loss of hepatic microsomal mixed function oxygenases. Res.Commun. in Chem.Pathol. and Pharmacol. Vol. 7, Nr.2, 321-332 (1974)

2. BARTLETT, C.R.: Phosphorus assay in column chromatography. J.biol.Chemistry 234, 466-468 (1959)

3. BERRY, C.S., HALLINAN, T.: Summary of a novel, three component regulatory model for uridine diphosphate glucuronyltransferase. Biochem.Soc.Transact. 4, 650-655 (1976)

4. BODE, CH., GOEBELL, H., STRAEHLER, E.: Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode. Z.klin.Chem.klin.Biochem. 6, 418-422 (1968)

5. BRODIE, B.B., AXELROD, J.: The fate of Aminopyrine in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material. J.Pharmacol.exp.Ther. 99, 171-184 (1950)

6. BURCHELL, B., LEAKEY, J., DUTTON, G.J.: Relationship between activating of detoxicating enzymes in stored broken-cell preparations and in autolysing liver. Enzyme 20, 156-164 (1975)

7. CONNELLAN, J.M., BUCHANAN, V.: The presence of isozymes of hexose-1-phosphate uridyltransferase from postmortem human liver, heart and kidney. Biochimica et Biophysica Acta 364, 68-77 (1974)

8. CREAVEN, P.J., WILLIAMS, R.T.: Post-mortem survival of aromatic hydroxylating activity in liver. Biochem.Journ. 87, 198-217 (1963)

9. DAWSON, R.M.C., EICHBERG, J.: Diphosphoinositide and Triphosphoinositide in animal tissues (Extraction, estimation and changes post mortem). Biochem.Journ. 96, 634-643 (1965)

10. DONHOFFER, H.: Quantitative estimation of lipids in needle biopsy sized specimens of cadaver liver. Acta Medica Academiae Scientiarum Hungaricae, Tomus 31 (1-2), 47-49 (1974)

11. FISKE, C.H., SUBBAROW, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. The Journal of Biological Chemistry 66, 375-400 (1925)

12. FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J.biol.Chemistry 226, 497-509 (1957)

13. GREIM, H.: Synthesesteigerung und Abbauhemmung bei der Vermehrung der mikrosomalen Cytochrome P 450 und b 5 durch Phenobarbital. Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 266, 261-275 (1970)

14. GRIMMEL, K., RICHTER, E., ZILLY, W., RABAST, U.: Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen zum Arzneimittelmetabolismus der Mastfettleber. Zschr.F.Gastroenterol. 13, 44 (1977)

15. HARPER, E.: Glucose-6-Phosphatase. In: H.U. BERGMAYER: Methoden der enzymati-

schen Analyse, Academic Press p. 788, New York 1963

16. HOGEBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C., PALADE, G.E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J.biol.Chemistry 172, 619-635 (1948)

17. JONDORF, W.R., DONAHUE, J.D.: The post mortem diminution of rat liver microsomal protein synthesizing and drug metabolising enzymes. Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 1, 581-590 (1970)

18. KARASEK, J.: Ultrastructural nuclear changes of extranucleolar ribonucleoprotein structures during autolysis of normal liver cells. Virchows Arch. B Cell Path. 18, 337-346 (1975)

19. KITAGAWA, H., KAMATAKI, T.: Studies on drug metabolism XII. Activity of liver microsomal drug metabolizing enzymes in human liver. Chem.Pharm.Bull. 19 (4), 827-830 (1971)

20. LEADBETTER, L., DAVIS, D.R.: The stability of the drug metabolising enzymes of liver microsomal preparations. Biochem.Pharmacol. 13, 1607-1617 (1964)

21. MACLEOD, S.M., RENTON, K.W., EADE, N.R.: Post mortem characteristics of the hepatic microsomal drug oxidising enzyme system. Chem.-Biol.Interactions 7, 29-37 (1973)

22. MARGOLIASH, E., FROHWIRT, N.: Spectrum of horse-heart cytochrom C.
Biochem.J. 71, 570-572 (1959)

23. MARSHALL, T.K.: Estimating the time of death.
Journal of forensic sciences 7, 189-210 (1962)

24. MASTERS, B.S.S., WILLIAMS, C.H., KAMIN, H.:
The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrom-c-reductase from pig liver.
Methods of enzymology 10, 565, Ed.by Colonick,S.P., Kaplan,N.O., Academic Press, New York, London 1967

25. NASH, T.: Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hentzsch reaction.
Biochem.J. 55, 416-422 (1953)

26. NUNLEY, W.C., DICKIE, M.W., SCHUIT, K.E.: Delayed, in vivo hepatic postmortem autolysis.
Virchows Arch.Abt.B.Zellpath. 14, 285-291 (1973)

27. OMURA, T., SATO, R.: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Solubilisation, purification, and properties.
J.biol.Chemistry 239, 2370-2384 (1964)

28. OUDEA, P.R.: Anoxic changes of liver cells.
Lab.Invest. 12, 486-494 (1963)

29. PARKER, F., PETERSEN, N.F.: Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acid from silica gel thin layer chromatograms.
J.Lipid.Res. 6, 455-461 (1965)

30. PETERS, W.H., LUBS, H., MACHILL, G., HEGEWALD, G.,

WEINKE, H., KIRST, R.:
Aminosäurenuntersuchung im Autopsiematerial.
Dt.Gesundheitswesen 30, 1960-1964 (1975)

31. RAFFUCCI, F.L., LEWIS, J.F., WANGENSTEEN, O.H.:
Hypothermia in experimental hepatic surgery.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 83, 639-640 (1953)

32. REBOUD, P.J., REBOUD, A.M., MADJAR, J.J., BUISSON, M.:
Study of protein reactivity in rat liver ribosomes. Effect of RNA addition to auto-digested ribosomes.
Acta biol.med.germ. 33, 667-676 (1974)

33. REMMER, H., SCHENKMANN, J., ESTABROOK, R.W., SASAME, H., GILLETTE, J., NARASIMHULU, S., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O.:
Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol.Pharmacol. 2, 187-190 (1966)

34. RICHTER, E., GRÜN, M., ZILLY, W., BRACHTEL, D., KÜHN, H.A.: Arzneimittelmetabolismus bei tier-experimenteller Cholestase.
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 78, 1402-1404 (1972)

35. RICHTER, E., GALLENKAMP, H., KELLER, B., BRACHTEL, D., ZILLY, W., BREIMER, D.D.:
Metabolismus von Hexobarbital bei Hepatitis und Zirrhose.
Z.Gastroenterol. 15, 381 (1977)

36. RIEDE, U.N., LOBINGER, A., GRÜNHOLZ, D., STEIMER, R., SANDRITTER, W.:
Einfluß einer einstündigen Autolyse auf die quantitative Zytoarchitektur der Rattenleberzelle. (Eine ultrastrukturell-morphometrische Studie)
Beitr.Path. 157, 391-411 (1976)

37. SCARPELLI, D.G., TRUMP, B.F.: Cell injury.
The Upjohn Company, 1971

38. SCHENKMANN, J.B., REMMER, H., ESTABROOK, R.W.:
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Molec.Pharmacol. 3, 113-123 (1967)

39. SCHNEIDER, W.C.: Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fractions.
J.biol.Chemistry 176, 259-266 (1948)

40. SCHOENE, B., FLEISCHMANN, R.A., REMMER, H., v.OLDERSHAUSEN, H.F.:
Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsy of human liver.
Europ.J.clin.Pharmacol. 4, 565-573 (1972)

41. SOTANIEMI, E.A., PELKONEN, R.O., AHOKAS, I.T., PIRTTIAHO, H.I., AHLQVIST, I.:
Relationship between in vivo and in vitro drug metabolism in man.
Europ.J.Drug Metab.Pharmakokinetics 1, 39 (1978)

42. TRUMP, B.F., ARSTILA, A.U.: Cell injury and cell death.
In: LA VIA,M.F. and R.B. HILL: Principles of pathobiology. P.9-95. Oxford University Press, New York, London, Toronto, 1971

43. VESELL, E.S., LANG, C.M., WHITE, W.J., PASSANANTI, G.Th., TRIPP, S.L.:
Hepatic drug metabolism in rats: impairment in a dirty environment.
Science 179, 896-897 (1973)

Herrn Prof. Dr. H. A. Kühn gilt mein Dank für die Arbeitsmöglichkeit in der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg.

Herrn Privatdozent Dr. H. Gallenkamp bin ich zu besonders großem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. W. Altmann danke ich für die Genehmigung zur postmortalen Leberpunktion und für die Einsichtnahme in die Sektionsprotokolle sowie Herrn Privatdozent Dr. W. Romen für die histologische Begutachtung der Leichenlebern.

L e b e n s l a u f

Am 24. Dezember 1949 wurde ich, Christine Berger, geb. Heisel, als älteste Tochter des Ingenieurs Alois Heisel und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Kraus, in Völklingen/ Saar geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Bous/ Saar, anschließend das Staatliche Mädchenrealgymnasium in Saarlouis, an dem ich im Juni 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 studierte ich an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken Romanistik und Anglistik. Mit dem Studium der Medizin begann ich im Sommersemester 1969 an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg; am 25. Juli 1975 bestand ich dort das Medizinische Staatsexamen.

Nach meiner Medizinalassistentenzeit im Städtischen Krankenhaus in Wertheim und an der Universitätsklinik in Würzburg wurde mir am 3.1.1977 die Approbation als Arzt erteilt. Seither befinde ich mich in der Weiterbildung zum Facharzt für Dermatologie an der Universitätshautklinik Würzburg.

Würzburg, den 23.5.1980

Christine Berger

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80